

wahren Wert einseitig nach oben oder unten abweicht. Durch die systematischen Fehler wird die Richtigkeit („accuracy“) der Analyse beeinflusst. Ursachen für das Auftreten systematischer Fehler, die sehr viel schwieriger zu erkennen sind als die zufälligen Fehler, wurden an anderer Stelle besprochen (3, 17). — Mit der Planung, Durchführung und Auswertung statistischer Untersuchungen ist ein vermehrter Arbeitsaufwand verbunden, der aber gerechtfertigt erscheint, da er dazu verhelfen kann, die Qualität der Analysenergebnisse zu

verbessern. In chemisch-analytischen Laboratorien haben statistische Methoden in den letzten Jahren weitgehend Eingang gefunden (vgl. 2, 6, 14, 23, 24). Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit der Absicht dargestellt, zur ausgedehnten Verwendung statistischer Methoden auch im klinisch-chemischen Laboratorium anzuregen.

Herrn Professor Dr. Dr. S. KOLLER, Mainz, danke ich für Anregungen zu diesen Untersuchungen, Fräulein Heinke GERBER für ihre Hilfe bei der Ausführung der Analysen.

### Literatur

1. FISHER, R. A., Statistical methods for research workers, 11. Aufl., Oliver & Boyd, Edinburgh (1950). — 2. DOERFFEL, K., Beurteilung von Analysenverfahren und -Ergebnissen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 3. BÜTTNER, H., Dtsch. med. Wschr. 88, 1050 (1963). — 4. BÜTTNER, H., Dtsch. med. Wschr. 88, 910 (1963). — 5. LINDER, A., Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, 3. Aufl. Birkhäuser-Verlag, Basel (1960). — 6. BENNETT, C. A. und N. L. FRANKLIN, Statistical analysis in chemistry and the chemical industry. J. Wiley & sons, New York-London (1954). — 7. MATHER, K., Statistische Analysen in der Biologie; deutsche Übersetzung von A. Zeller, Springer-Verlag, Wien (1954). — 8. KOLLER, S., Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II, S. 931. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955). — 9. KOLLER, S., Statistische Auswertungsmethoden, in: Biochemisches Taschenbuch, herausgegeben von H. M. Rauen, 2. Aufl. Band II, S. 959, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964). — 10. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl., Basel (1960). — 11. GRAF, U. und H.-J. HENNING, Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958). — 12. VAN DER WAERDEN, B. L., Mathematische Statistik. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957). — 13. WERNIMONT, G., Analytic. Chem. 23, 1572 (1951). — 14. YODEN, W. J., Statistical methods for chemists, J. Wiley & sons, New York-London (1951). — 15. MATTHIAS, R. H., Analytic. Chem. 29, 1046 (1957). — 16. WEYBREW, J. A., G. MATRONE und H. M. BOXLEY, Analytic. Chem. 20, 759 (1948). — 17. BÜTTNER, H., Method. Inform. Med. 3, 105 (1964). — 18. CASTER, W. O., Analytic. Chem. 23, 1229 (1951). — 19. KORTÜM, G., Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 20. KREITZ, L. K., A. S. O'BRIEN und T. L. DAVIS, Analytic. Chem. 22, 1170 (1950). — 21. MAURICE, M. J. und B. VEEN, Z. analyt. Chem. 163, 13 (1958). — 22. MAURICE, M. J. und B. G. WIGGERS, Z. analyt. Chem. 168, 335 (1959). — 23. GOTTSCHALK, G., Statistik in der quantitativen chemischen Analyse (Die chemische Analyse Bd. 49), Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart (1962). — 24. NELSON, B. N., Analytic. Chem. 36, 344 R (1964).

Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Büttner  
I. Medizinische Univ.-Klinik  
23 Kiel, Schittenhelmstr. 12

## The enzymatic L(+)-lactate determination in blood

by J. PARIJS and F. BARBIER

*From the State University of Ghent, Policlinic for Internal Medicine (Director Prof. Dr. L. Remouchamps).*

(Der Schriftleitung zugegangen am 19. Dezember 1964)

To obtain quantitative L(+)-lactate determinations in blood using nicotinamide adenosine dinucleotide and lactic dehydrogenase, it is necessary to use standard solutions instead of the calculated conversion factor.

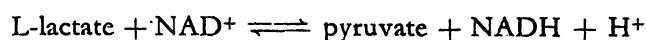
Um quantitative L(+)-Lactat-Bestimmungen im Blut unter Verwendung von Nicotinamid-adenosin-dinucleotid zu erhalten, ist es erforderlich, Standardlösungen anstelle eines berechneten Umsatzfaktors zu benutzen.

A method for enzymatic determination of L(+)-lactate in blood has been described (1—3). The present experiment was designed to gain information on the quantitative character of the method using nicotinamide adenosine dinucleotide and lactic acid dehydrogenase.

### Method

We used the Boehringer test-combination where L-lactate and nicotinamide adenosine dinucleotide ("NAD") are converted by means of lactic acid dehydrogenase ("LDH") to pyruvate and nicotinamide

adenosine dinucleotide reduced ("NADH"). The increase of extinction is measured spectrophotometrically according to the principle outlined by WARBURG (4). At the physiological pH the equilibrium-constant of the reaction (Ke):



is equal to  $2,9 \cdot 10^{-12}$  Mol/l at  $25^\circ$  (5).

The equilibrium constant increases considerably by alcalining the medium (pH = 9), adding an excess of NAD and removing the developed pyruvate as hydrazone from the reaction mixture.

#### Reactives

1. glycine buffer (pH = 9); 0,5 m glycine and 0,4 m hydrazine
2. NAD solution; 0,027 m
3. LDH suspension; 2 mg enzymeprotein/ml
4. perchloric acid solution; 0,6 m

#### Deproteinisation

1 ml perchloric acid solution and 1 ml blood are well mixed and centrifuged.

#### Measurement

In a test-tube are transferred successively:

- 2,00 ml glycin buffer
- 0,10 ml supernatant (after centrifugation)
- 0,03 ml LDH-suspension
- 0,20 ml NAD-solution.

After mixing, the tube is left 1 hour at  $25^\circ$ . At the same time a blank tube in which 0,1 ml diluted perchloric acid solution (1 vol. 0,6 m solution + 1 vol. distilled water) was substituted for the supernatant, is prepared.

After exactly 1 hour 0,8 ml distilled water is added to both tubes and after mixing, their optical densities were read at 366 m $\mu$  against water, using a 1,0 cm path-length cuvette.

#### Calculation

If "v" the volume of blood sample, then  $\frac{v \times 0,1}{v + 1}$  represents the fraction of the sample, present in 0,1 ml supernatant. As the amount of the formed NADH is equivalent to the amount of the converted lactate, the concentration of lactic acid can be calculated, according to the following formula (7):

$$\frac{v + 1}{v \times 0,1} \times \frac{\Delta E}{0,100} \times 3,13 \times 0,030 = \text{mMol lactic acid/l}$$

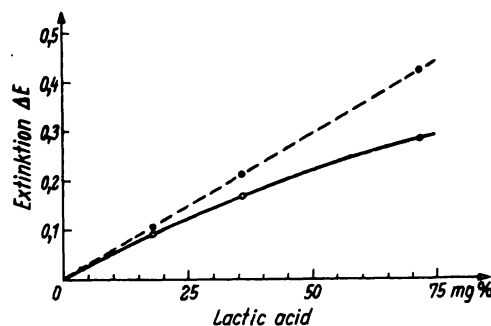
or:

$$\frac{1 + 1}{1 \times 0,1} \times \frac{\Delta E}{0,100} \times 3,13 \times 0,030 \times 9 = \Delta E \times 169 = \text{mg}$$

lactic acid/100 ml blood.

#### Results and discussion

The formula  $\Delta E \times 169 = \text{mg}/100 \text{ ml}$  is correct on the condition that all lactic acid is converted into pyruvic acid. To examine this assumption, we prepared standards of 18 of 36 and of 72 mg% lactic acid. We found respectively  $\Delta E$ 's of 0,093 — 0,162 and 0,288 instead of the expected  $\Delta E$ 's 0,106 — 0,213 and 0,426 (see diagram).



Relation between the theoretical and the actual calibration curves.

The dotted line represents the *theoretical curve* if all lactate is converted into pyruvate. — The straight line represents the curve derived from the *actual photometric readings*.

A tenfold determination performed on the same supernatant after deproteinisation gave following results: 22,2 — 22,1 — 22,9 — 22,5 — 22,7 — 21,4 — 22,3 — 23,2 — 22,4 and 22,3 mg% (mean: 22,3 mg%; SD:  $\pm 0,3 \text{ mg\%}$ ). Using the standard curve, the recovery rate of known amounts of lactic acid added to supernatant after deproteinisation is 98 to 101%.

The conversion of lactate into pyruvate is not quantitative. The higher the amount of lactate introduced in the test, the higher the percentage of not-converted lactate. This is probably due to the following facts: the excess of NAD becomes too small; the hydrolysis of the hydrazone of pyruvic acid increases, the excess of hydrazine decreasing.

The authors wish to express their appreciation to professor RUYSEN and to professor DE MOERLOOSE for their valuable suggestions in the preparation of this manuscript.

#### References

1. HORN, H. D. and F. H. BRUNS, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 21, 378 (1956). — 2. HOHORST, H. S., *Biochem. Z.* 328, 509 (1957). — 3. SCHOLZ, R., H. SCHMITZ, TH. BÜCHNER and J. O. LAMPEN, *Biochem. Z.* 331, 71 (1959). — 4. WARBURG, O., W. CHRISTIAN and A. GRIESE, *Biochem. Z.* 282, 157 (1935). — 5. BERGMAYER, H. U., *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962).

Dr. F. Barbier  
Gent (Belgien), De Pintelaan